



Research Article

Isolation of bacteria contained in vermicompost with antifungal activity of chili anthracnose

Saowapha Surawut^{1,*} Chutapa Kunsook¹ Sutisa Chaikul² and Rujeerat Jaikong³

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi Province

²Faculty of Agricultural Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi Province

³Microbiology Program, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

*Email: saowapha.s@rbru.ac.th

Received <3 April 2023>; Revised <30 May 2023>; Accepted <30 May 2023>

Abstract

The study aimed to isolate bacteria contained in vermicompost with the antifungal activity of chili anthracnose. The causative agent of chili anthracnose was isolated and identified. Subsequently, the bacteria were isolated from vermicompost, their antifungal activities were investigated by the dual culture method and identified by morphology. The results found that the fungal pathogen of chili anthracnose was isolated and identified as *Colletotrichum siamense* by morphological characteristics and sequence analysis of ITS (Internal Transcribed Spacer), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), and TUB2 (Beta-tubulin2) gene. Twenty bacterial isolates were isolated from vermicompost. Among these isolates, 4 bacterial isolates revealed antifungal activity against *C. siamense* including B5, B3, A6, and A5 with inhibition percentages as 47.78±3.85%, 34.45±10.72%, 34.44±1.93% and 26.67±3.34%, respectively. These bacterial isolates were presumptively identified by morphology revealing that all bacteria isolated were classified as the endospore-forming gram-positive rod.

Keywords: Vermicompost, Bacteria, Inhibition, Chili Anthracnose

บทความวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรกซ์ในพริก

เสาวภา สุราวุธ^{1*} ชุตามา คุณสุข¹ สุทิศา ชัยกุล² และรุจิรัตน์ ใจคง³

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

² คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

³ หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

*Email: saowapha.s@rbru.ac.th

รับบทความ: 3 เมษายน 2566 แก้ไขบทความ: 30 พฤษภาคม 2566 ยอมรับตีพิมพ์: 30 พฤษภาคม 2566

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรกซ์ในพริก โดยทำการคัดแยกและระบุชนิดเชื้อราก่อโรคแอนแทรกซ์ในพริก จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน แล้วทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรกซ์ด้วยวิธี dual culture และทำการระบุชนิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้ง ผลการศึกษาพบว่า ทำการคัดแยกเชื้อราก่อโรคแอนแทรกซ์และระบุชนิดโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ITS (Internal Transcribed Spacer), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) และ TUB2 (Beta-tubulin2) สามารถระบุชนิดเชื้อราก่อโรคได้เป็น *Colletotrichum siamense* และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนได้ จำนวน 20 ไอโซเลต โดยในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. siamense* พบแบคทีเรียที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อรา *C. siamense* จำนวน 4 ไอโซเลต คือ B5, B3, A6 และ A5 ซึ่งมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 47.78 ± 3.85 , 34.45 ± 10.72 , 34.44 ± 1.93 และ 26.67 ± 3.34 ตามลำดับ เมื่อทำการระบุชนิดแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม endospore-forming gram-positive rod

คำสำคัญ: ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน แบคทีเรีย การยับยั้ง โรคแอนแทรกซ์ในพริก

บทนำ

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่ง แต่เกษตรกรที่ปลูกพริกกลับประสบปัญหาโรคที่เกิดในพริก ทำให้ผลผลิตเสียหายและไม่ได้ราคา โดยโรคที่เป็นปัญหามากที่สุดในผลผลิตพริกของเกษตรกรคือ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) หรือโรคกุ้งแห้ง สาเหตุเกิดจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* spp. ซึ่งในประเทศไทยพบรายงานเชื้อราสกุลนี้ 4 ชนิดที่ก่อโรคในพริก คือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. acutatum* และ *C. capsica* (Suwannarat et al., 2017) ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถเข้าทำลายต้นพริกได้ทุกระยะและทุกส่วนทั้งลำต้น ใบ ดอก และผลพริก โดยเฉพาะอาการเป็นโรคที่ผลจะทำให้สูญเสียผลผลิตมากและยังเป็นปัญหาที่เกษตรกรยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเกิดโรคบนผลพริกจัดว่าเป็นทั้งโรคก่อนเก็บเกี่ยวและเป็นโรคหลังเก็บเกี่ยว เชื้อราในกลุ่มนี้สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ อาจอาศัยอยู่ในดิน เศษซากพืชที่เป็นโรคที่ปล่อยทิ้งไว้ในแปลงปลูก หรือพืชอาศัยชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เชื้อโรคแพร่กระจาย โดยที่เชื้อราในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส ความชื้น 80% ดังนั้น โรคแอนแทรคโนสจะแพร่กระจายมากและระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน (Saxena et al., 2016; Than et al., 2008).

การป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดขึ้นมีหลายวิธี แต่ส่วนใหญ่เกษตรกรมักใช้สารเคมีในการป้องกันและควบคุมโรคเนื่องจากทำได้ง่ายและเห็นผลเร็ว แต่สารเคมีที่ใช้ทางการเกษตรเป็นสารพิษอันตรายที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งส่วนมากเกิดจากการสัมผัสสารเคมีหรือใช้สารเคมีไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง นอกจากนี้สารเคมียังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ระบบนิเวศ และห่วงโซ่อาหารอีกด้วย จากข้อเสียของการใช้สารเคมีดังกล่าวข้างต้น จึงควรมีการใช้วิธีการอื่น ๆ ทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) การใช้สารอินทรีย์จากธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการหมักในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สารชีวภัณฑ์ น้ำหมัก ปุ๋ยหมัก (Saxena et al., 2016; Than et al., 2008).

ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน (vermicompost) เป็นการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ เกิดจากซากอินทรีย์วัตถุรวมทั้งดินและจุลินทรีย์ที่ไส้เดือนดินกินเข้าไปแล้วผ่านกระบวนการย่อยสลาย ขับถ่ายออกมาเป็นมูล มีลักษณะเป็นเม็ดสีดำ มีธาตุอาหารที่พืชนำไปใช้ได้ และยังจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เป็นองค์ประกอบ (Tangsombatvichit and Buranasaksee, 2019). โดยในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนมีการใช้ชนิดของไส้เดือนที่แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา รวมทั้งพบแบคทีเรียที่เป็นองค์ประกอบในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่แตกต่างกัน ดังเช่นในรายงานของ Madsen and Alexander (1982) ได้ใช้ไส้เดือนชนิด *Lumbricus rubellus* ซึ่งพบแบคทีเรียในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่ช่วยกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนพืชเพื่อการเจริญเติบโต คือ *Rhizobium japoicum* และ *Pseudomonas putia* โดยในรายงานของ Vaz-Moreira et al. (2008) ใช้ไส้เดือนชนิด *Eisenia foetida* ซึ่งพบแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *B. megaterium*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* โดยแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติในการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และในรายงานของ Yasir et al. (2009) ได้ทำการศึกษาปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่ใช้ไส้เดือนชนิด *E. foetida* ซึ่งพบแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria และ Firmicutes โดยแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค เช่น *Colletotrichum coccodes*, *Rizoctonia solani* เป็นต้น โดยในการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* spp. มักทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture ดังเช่นในรายงานของ Yutthasin et al. (2018) ที่ได้นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 13 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* โดยวิธี dual culture technique พบว่าเชื้อ *Bacillus* จำนวน 6 ไอโซเลต มีความสามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 ชนิด

วิสาหกิจชุมชน อำเภอน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ได้ทำการผลิตและพัฒนาปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร ซึ่งจากการใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนในแปลงเพาะปลูกพริกชี้หนุที่พบการระบาดของโรค สังเกตพบว่าต้นพริกชี้หนุมีอัตราการเกิดโรคติดเชือราลดลง แต่ทั้งนี้ยังไม่ได้ทำการทดลองอย่างเป็นระบบ โดยมีสมมุติฐานว่าในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนอาจจะมีจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพริกได้ โดยวิสาหกิจชุมชนได้ทำการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนจำนวน 3 สายพันธุ์ร่วมกัน คือ *Eudrilus eugeniye*, *Eisenia hortensis* และ *Perionyx excavates* แล้วจึงนำปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่ได้มาใช้ในการศึกษาค้นคว้า

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่ามีแบคทีเรียชนิดใดบ้างที่เป็นองค์ประกอบในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนการใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน นอกจากการใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชผลทางการเกษตรแล้ว ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนยังอาจมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์เป็นองค์ประกอบ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีและเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

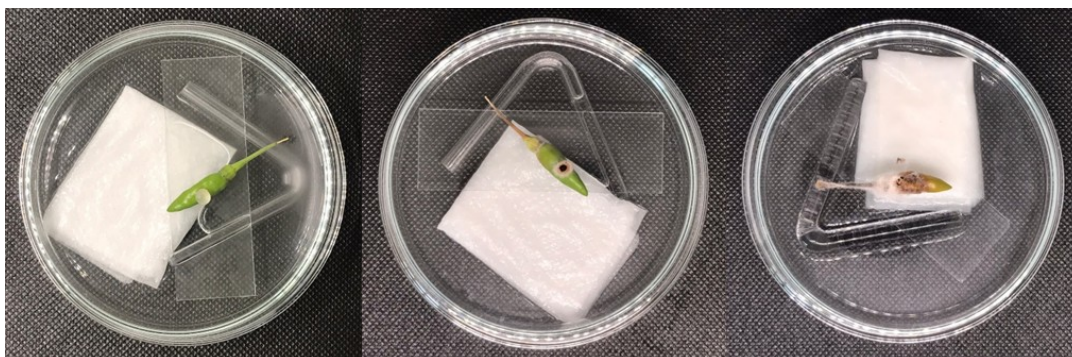
วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดแยกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

เก็บผลพริกที่มีอาการของโรคจากแปลงของเกษตรกร อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ตัดชิ้นส่วนของพริกที่มีรอยโรคและบริเวณที่มีเนื้อเยื่อปกติ นำมาฆ่าเชื้อภายนอกโดยการแช่ใน 1% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนพริกมาวางบนอาหารวุ้น Potato Dextrose Agar (HiMedia, India) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพริก แล้วนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA อีกครั้ง

การพิสูจน์การเกิดโรค

นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการติดเชื้อบนผลพริกปกติ เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามทฤษฎีของ Koch (Koch's postulation) โดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ทำการเจาะส่วนขอบโคโลนีของเชื้อราที่วางบนผลพริกที่ไม่เป็นโรค บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการสังเกตรอยโรคที่เกิดขึ้นบนผลพริก เมื่อสังเกตเห็นผลพริกมีรอยโรคเกิดขึ้น ให้ทำการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพริกมาวางบนอาหารวุ้น PDA แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีและทำการแยกเชื้อซ้ำลงบนอาหาร PDA อีกครั้งหนึ่ง สังเกตลักษณะโคโลนีและศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการเตรียม slide culture (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การพิสูจน์การเกิดโรคตามทฤษฎีของ Koch (Koch's postulation)

การตรวจสอบชนิดเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

นำเชื้อราที่ผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อราก่อโรคพริกจริง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร Potato Dextrose Agar (HiMedia, India) และการเตรียม slide culture ด้วยการย้อมสี lactophenol cotton blue เพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x จากนั้นทำการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit โดยวิธีการตามคู่มือ (Flavogen, Taiwan) แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มชิ้นส่วน DNA จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ITS (Internal Transcribed Spacer), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) และ TUB2 (Beta-tubulin2) ด้วย primer ดังตารางที่ 1 โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 2 และสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3-5 แล้วทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ที่กำลังไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ 2% agarose gel ที่ผสม RedSafe (iNtRONbiotechnology, Korea) ซึ่ง PCR product ที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit ดังวิธีการตามคู่มือ (Macherey-Nagel, Germany) แล้วนำส่งตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท เอ ที จี ซี จำกัด (ปทุมธานี ประเทศไทย) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการ BLAST ในฐานข้อมูล GenBank® เพื่อตรวจสอบและยืนยันชนิดของเชื้อราก่อโรค

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อราก่อโรคในพริก

DNA target	Primer	Sequence (5' to 3')	PCR product	Reference
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 bp	Raja <i>et al.</i> (2017)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
GAPDH	GDF-F	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	300 bp	Khodadadi <i>et al.</i> (2020)
	GDF-R	GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT		
TUB2	T1-F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	600 bp	Khodadadi <i>et al.</i> (2020)
	T2-R	TAGTGACCCCTGGCCAGTTG		

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)	Final concentration
น้ำกลั่น	6	-
2x mastermix (Apsalagen, Thailand)	10	1x
Forward Primer	1	0.5 μM
Reverse Primer	1	0.5 μM
DNA template	2	10 pg-1 μg

ตารางที่ 3 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับตำแหน่ง ITS

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
Denaturation	35	95 °C	30 sec
Annealing		52 °C	30 sec
Extension		72 °C	1 min
Final extension	1	72 °C	10 min

ตารางที่ 4 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับตำแหน่ง GAPDH

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
Denaturation	35	95 °C	30 sec
Annealing		60 °C	30 sec
Extension		72 °C	45 sec
Final extension	1	72 °C	10 min

ตารางที่ 5 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับตำแหน่ง TUB2

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
Denaturation	35	95 °C	30 sec
Annealing		61 °C	30 sec
Extension		72 °C	45 sec
Final extension	1	72 °C	10 min

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน

นำปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของวิสาหกิจชุมชน อำเภอบึงน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนจำนวน 25 กรัม ใส่ในขวดปลอดเชื้อ เทสารละลาย 0.1% peptone water เพื่อเจือจางตัวอย่างให้ได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นตามลำดับ (serial dilution) แล้วทำการ spread plate โดยปิเปตปริมาตรตัวอย่าง 0.1 ml ลงบนอาหาร Plate Count Agar (HiMedia, India) แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการ cross streak บนอาหาร Nutrient Agar (HiMedia, India) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

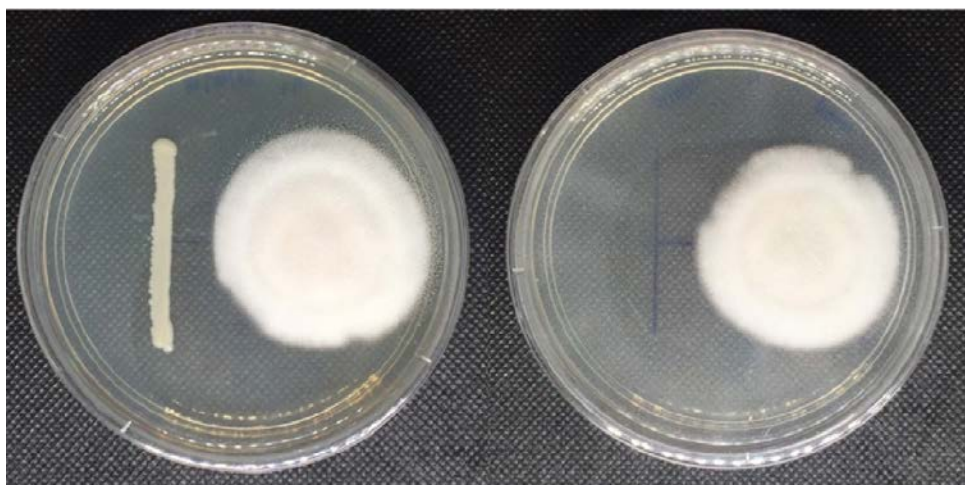
การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคบนจานเพาะเชื้อเดียวกัน (Dual culture technique) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพริก อายุ 7 วัน นำมาวางบนอาหาร PDA โดยวางห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร และใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ทำการขีดลากเชื้อแบคทีเรีย อายุ 24 ชั่วโมง เป็นเส้นตรงในทิศทางตรงข้ามกันและห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ดังภาพที่ 2 โดยมีจานเพาะเชื้อราสาเหตุโรคพริกเพียงอย่างเดียวเป็นจานควบคุมและทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำเช่นเดียวกันนี้กับแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยสังเกตการเจริญของแบคทีเรียใน 18 – 24 ชั่วโมง และสังเกตการเจริญของเชื้อราในวันที่ 4-7 ของการเพาะเชื้อ เมื่อบ่มจานเพาะเชื้อครบ 7 วัน จึงวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อราและนำค่าที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง โดยใช้สูตรคำนวณของ Tronsmo (1992)

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \left(\frac{R_1 - R_2}{R_1} \right) \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราก่อโรคพริกในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราก่อโรคพริกในจานทดสอบ



ภาพที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพริกกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

การศึกษาชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก จะทำให้ทราบว่าแบคทีเรียไอโซเลตใดที่มีความสามารถในการยับยั้ง จากนั้นนำมาทำการจัดจำแนกโดยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ประกอบด้วย ลักษณะโคโลนี ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยย้อมสีแกรมและการย้อมสีเอนโดสปอร์ โดยทำการเพาะเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (HiMedia, India) อายุ 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียเกลี่ย (smear) บนกระจกสไลด์ จากนั้นทำการย้อมสีแกรม (Gram staining) โดยการหยดสี crystal violet บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง ล้างน้ำหยดสารละลาย Gram's iodine บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างน้ำ ล้างสีออกด้วย ethanol 95% ทิ้งไว้ไม่เกิน 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด หยดสี safranin บนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ประมาณ 45-60 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาลักษณะเซลล์ การติดสี และการจัดเรียงตัว สำหรับการย้อมสีเอนโดสปอร์ (Endospore staining)

หยดสี malachite green ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ แล้วลนด้วยเปลวไฟโดยตรง ต้องระวังไม่ให้สีเดือดหรือแห้งไป ถ้าสีเริ่มแห้งให้หยดสีลงบนสไลด์ เรื่อย ๆ อย่าให้แห้ง ย้อมเป็นเวลา 5-10 นาที ปลอ่ยให้สไลด์เย็นลงแล้วล้างน้ำ ย้อมทับด้วยสี safranin นาน 30-60 วินาที ล้างน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X จะเห็นสปอร์ติดสีเขียวของ malachite green ส่วนอื่น ๆ ของเซลล์ติดสีแดงของ safranin

ผลการวิจัย

ผลการระบุชนิดเชื้อราก่อโรคพริก

เพื่อคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคในพริกที่พบระบาดในแปลงของเกษตรกร อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี จึงทำการคัดแยกเชื้อราที่เจริญจากเนื้อเยื่อของพริก จากนั้นนำเชื้อราที่ได้ไปทำการพิสูจน์การก่อโรค และทำการระบุชนิด พบเชื้อราก่อโรคมมีลักษณะโคโลนี เส้นใยสีขาวฟู และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการสร้าง conidia และ appressorium (ภาพที่ 3) เมื่อทำการระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ITS, GAPDH และ TUB2 แล้วนำไปทำการ BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ได้ผลดังตารางที่ 6 โดยพบว่าเชื้อราก่อโรคพริกสามารถระบุชนิดได้เป็น *Colletotrichum siamense*



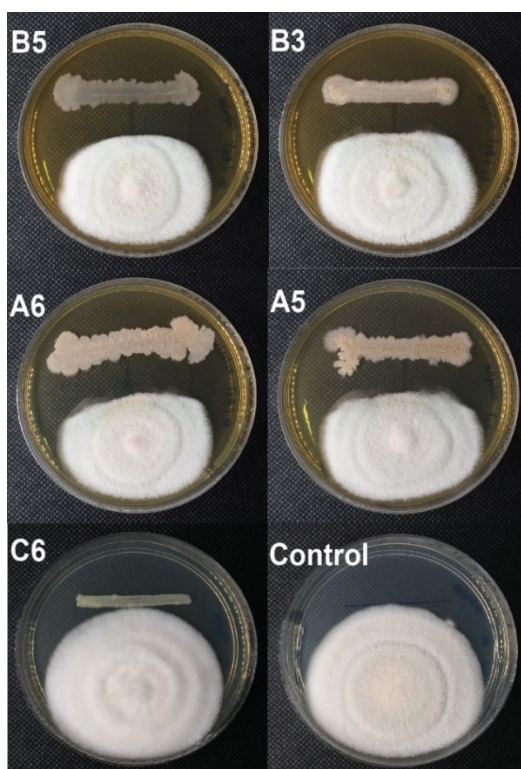
ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *Colletotrichum siamense*
หัวลูกศรสีดำ : appressorium, หัวลูกศรสีขาว : conidia

ตารางที่ 6 ผลการ BLAST ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS, GAPDH และ TUB2 ของเชื้อราก่อโรคพริก

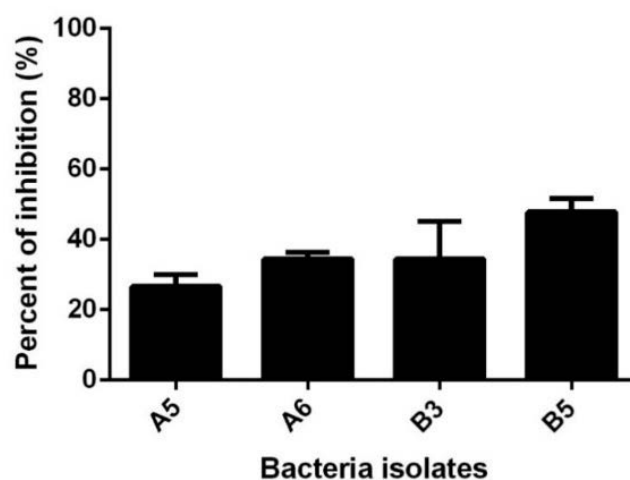
Gene position	Best match (Accession No.)	Similarity (%)
ITS	<i>Colletotrichum siamense</i> (MH883640.1)	100
GAPDH	<i>Colletotrichum siamense</i> (MK141756.1)	99.59
TUB2	<i>Colletotrichum siamense</i> (JF811021.1)	99.57

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนและการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak พบแบคทีเรียในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน จำนวน 20 ไอโซเลต (isolates) ในการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก *Colletotrichum siamense* กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน พบแบคทีเรียที่แสดงผลการยับยั้งราก่อโรค จำนวน 4 ไอโซเลต คือ B5, B3, A6 และ A5 มีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 47.78 ± 3.85 , 34.45 ± 10.72 , 34.44 ± 1.93 และ 26.67 ± 3.34 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5)



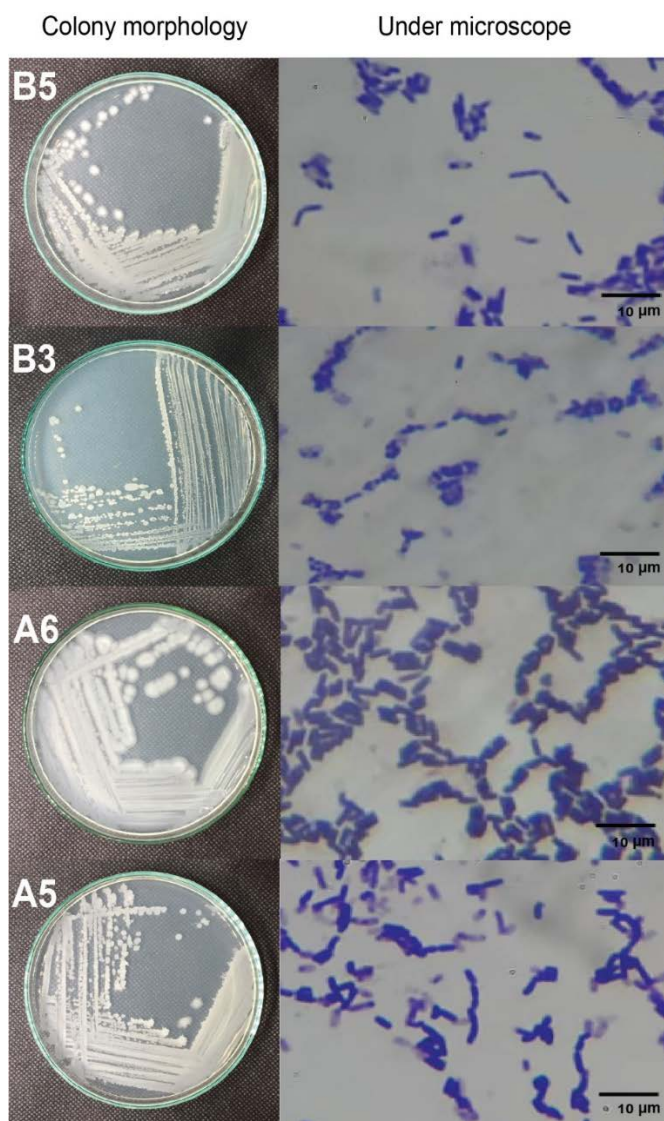
ภาพที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum siamense* กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน โดย B5, B3, A6 และ A5 คือแบคทีเรียที่แสดงผลการยับยั้ง, C6 คือ แบคทีเรียที่ไม่แสดงผลการยับยั้ง, Control คือ เชื้อรา *Colletotrichum siamense* ในจานควบคุม



ภาพที่ 5 แผนภูมิร้อยละการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum siamense* กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน

ผลการระบุชนิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพริก

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตโคโลนีมีลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบหยัก ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างท่อน ต่อกันเป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก (ภาพที่ 6) เมื่อทำการย้อมเอนโดสปอร์ (endospore) พบว่าทั้งหมดสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ จึงจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม endospore-forming gram-positive rod



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum siamense*

อภิปรายผล

ในการศึกษารั้งนี้ ได้ทำการคัดแยกเชื้อราก่อโรคพริกในแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร สามารถระบุชนิดเชื้อราก่อโรคพริกได้ว่าเป็น *Colletotrichum siamense* โดยมีรายงานว่า เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ในพริก และพบก่อโรคได้ในประเทศไทย (Saxena *et al.*, 2016) จากนั้นจึงทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน พบแบคทีเรีย จำนวน 20 ไอโซเลต แล้วทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *C. siamense* กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยวิธี Dual culture technique

จากการศึกษารั้งนี้พบว่า เชื้อแบคทีเรีย B5 ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพริก *C. siamense* ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ ร้อยละ 47.78 ± 3.85 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยกว่าการศึกษาของ Yutthasin *et al.* (2018) ที่ได้นำเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 13 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* โดยวิธี dual culture technique เช่นเดียวกัน พบว่า เชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต DL7, DL9, B23/2, 19w6, 20w16 และ 20w33 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 ชนิด ได้มากกว่า 60% นอกจากนี้ในการศึกษาของ Thapanapongworakul *et al.* (2020) ซึ่งมีการใช้วิธี sealed plate ร่วมด้วยพบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. CT20 สามารถสร้างสารระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* Coll-1 ได้ดีที่สุดในเวลา 120 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการยับยั้งสูงถึง 64.17

ในการศึกษารั้งนี้ พบแบคทีเรียที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *C. siamense* คือ B5, B3, A6 และ A5 มีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 47.78 ± 3.85 , 34.45 ± 10.72 , 34.44 ± 1.93 และ 26.67 ± 3.34 ตามลำดับ จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยก

ได้ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งที่ไม่ได้แตกต่างกันมาก และการที่มีความสามารถใกล้เคียงกัน มีความเป็นไปได้ว่า อาจจะเป็นเชื้อกลุ่มเดียวกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ซึ่งจากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะ โคลนีสและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่คล้ายกัน อย่างไรก็ตาม ผลการยับยั้งที่แสดงผลไม่เท่ากันอาจเนื่องมาจากเป็นเชื้อ แบคทีเรียคนละสปีชีส์หรือคนละสายพันธุ์ (strain) ซึ่งในการระบุชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าเชื้อ แบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. siamense* จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ จัดอยู่ในกลุ่ม endospore forming gram positive rod เช่นเดียวกับในรายงาน การศึกษาของ Vaz-Moreira *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษานิดของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นองค์ประกอบในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน พบแบคทีเรียกลุ่ม endospore forming gram positive rod ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus* sp., *B. megaterium*, *B. pumilus* และ *B. subtilis*

ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เพื่อการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) และมีการจำหน่ายทางการค้าคือ เชื้อรา ในสกุล *Trichoderma* โดยมีรายงานวิจัยหลายการศึกษาที่สนับสนุนการใช้เชื้อราชนิดนี้ ดังเช่นในการศึกษาของ Chuenchan *et al.* (2019) พบว่า *Trichoderma harzianum* MKB11 และ MKB01 มีร้อยละการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชเท่ากับ 86.28 และ 81.51 ตามลำดับ และในการศึกษาของ Thienchai and Nuangmek (2020) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. (L1I3) และ *T. harzianum* (R24I2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium equiseti* สาเหตุโรคเหี่ยวของเมล่อน ได้ถึงร้อยละการยับยั้ง 80.88 และ 84.16 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสกุล *Trichoderma* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ สารพิษ และ เอนไซม์ สำหรับช่วยในการละลายผนังเส้นใยของเชื้อก่อโรคพืชได้และยังสามารถนำมาพัฒนาให้อยู่ในรูปของสารชีวภัณฑ์ ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม เชื้อแบคทีเรียได้มีรายงานการใช้เพื่อเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมทางชีวภาพ เช่น เชื้อ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* และ *Agrobacterium* ซึ่งมีการจำหน่ายทางการค้า แต่ ประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับกลไกของเชื้อโรคเป้าหมาย ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ และสภาพแวดล้อมที่ใช้งาน โดยมีรายงานว่าสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสาร เช่น bacillomycin, mycosubtilin เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด รวมทั้ง *Colletotrichum* spp. ด้วย (Pal and Gardener, 2006)

ถึงแม้ในการศึกษาครั้งนี้จะพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้น้อยกว่าใน รายงานการศึกษาอื่น แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้ก็ทำให้ทราบว่าในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของวิสาหกิจชุมชน อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี มีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืชผลทางการเกษตร เช่น พริก เป็นต้น โดยมีความสามารถในการ ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกคือ *C. siamense* ดังแสดงในผลการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นนอกจากการใช้ปุ๋ยหมักมูล ไส้เดือนเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชผลทางการเกษตรแล้ว ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนยังมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์เป็นองค์ประกอบโดย มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชอีกด้วย

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะจากการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาวานปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนที่ผลิตโดยวิสาหกิจชุมชน อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี มีจุลินทรีย์ที่เป็น ประโยชน์เป็นส่วนประกอบหรือไม่ จึงนำแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้ จำนวน 20 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 4 ไอโซเลตที่แสดงผลการ ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum siamense* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก คือ B5, B3, A6 และ A5 และมี ร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 47.78 ± 3.85 , 34.45 ± 10.72 , 34.44 ± 1.93 และ 26.67 ± 3.34 ตามลำดับ เมื่อทำการระบุชนิดแบคทีเรีย ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยลักษณะโคลนีส การย้อมสีแกรม และการย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่า แบคทีเรียทุก ไอโซเลตจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม endospore-forming gram-positive rod ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสกุล และระดับชนิดได้ ดังนั้นในการระบุชนิดจึงต้องทำการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างของชนิด แบคทีเรียได้ รวมทั้งอาจต้องใช้วิธีทางอณูชีววิทยาโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีนที่จำเพาะเพื่อให้ สามารถระบุชนิดแบคทีเรียได้อย่างถูกต้อง ทั้งนี้จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นว่าในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนมีแบคทีเรีย บางชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก (*Colletotrichum siamense*) ได้ ดังนั้น การใช้ปุ๋ย หมักมูลไส้เดือนทางการเกษตร นอกจากเพื่อการบำรุงต้นพืชแล้ว ยังอาจช่วยยับยั้งการเกิดโรคบางชนิดในพืชได้ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมภายใต้สภาพโรงเรือนและแปลงปลูกเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชด้วยปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และสำนักงานคณะกรรมการ ส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สัญญาเลขที่ 1101/2565)

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์หรือสัตว์

ไม่มี

References

- Chuenchan, W., Raksasanoy, S., Yooboriboon, S. and Kitja, W. (2019). Inhibition of *Phytophthora parasitica* by antagonistic molds from Soil's Kuiburi Subdistrict, Prachuap Khiri Khan Province. **Journal of Science Ladkrabang**, 28 (1), 52-64.
- Khodadadi, F., González, J. B., Martin, P. L., Giroux, E., Bilodeau, G. J., Peter, K. A., Doyle, V. P. and Aćimović, S. G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. **Scientific Reports**, 10(1), 11043.
- Madsen, E.L. and Alexander, M. (1982). Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. **Soil Science Society of America**, 46, 557-560.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**. 2: 1117-1142.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. and Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, 80(3), 756–770.
- Saxena, A., Raghuvanshi, R., Gupta, V. K. and Singh, H. B. (2016). Chilli Anthracnose: The epidemiology and management. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1-18.
- Suwannarat, S., Steinkellner, S., Songkumarn, P. and Sangchote, S. (2017). Diversity of *Colletotrichum* spp. isolated from chili pepper fruit exhibiting symptoms of anthracnose in Thailand. **Mycological Progress**, 16(7), 677-86.
- Tangsombatvichit, P. and Buranasaksee, U. (2019). Vermicomposting: Biological technology for soil conservation and organic wastes management in Thailand. **Phranakhon Rajabhat Research Journal (Science and Technology)**. 14 (2), 170-181.
- Than, P.P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P.W. and Hyde, K.D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, 9(10), 764–778.
- Thapanapongworakul, P., Duongta, W., Truektrakronburi, M. and Srichuwong, S. (2020). Antagonistic potential of *Streptomyces* spp. and *Bacillus subtilis* against phytopathogenic fungus causing anthracnose disease of chilli. **Khon Kaen Agriculture Journal**, 49 (3), 656-667.
- Thienchai, P. and Nuangmek, W. (2020). Effect of endophytic fungi *Trichoderma* sp. (L113) and *Trichoderma harzianum* (R24 I2) against *Fusarium equiseti* causal agent of melon wilt disease in vitro. **Khon Kaen Agriculture Journal**, 48 Suppl. 1, 1155-1158.
- Tronsmo, A. (1992). Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological control agent of plant disease. Pages. 43-54 In: Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. (eds.) Biological control of plant disease; progress and challenges for the future. **NATO ASI series. A life sciences** vol 230, Plenum Press, New York.
- Vaz-Moreira, I., Silva, M. E., Manaia, C. M. and Nunes, O. C. (2008). Diversity of Bacterial Isolates from Commercial and Homemade Composts. **Microbial Ecology**, 55(4), 714-722.
- Yasir, M., Aslam, Z., Kim, S.W., Lee, S.W., Jeon, C.O. and Chung, Y.R. (2009). Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. **Bioresource Technology**, 100, 4396-4403.
- Yutthasin, R., Worasatit, N., Thomma, K., Dumkhum, W. and Seelarak, P. (2018). Selection of potential antagonistic *Bacillus* species to broad spectrum for control *Colletotrichum* spp., causal agent of chilli anthracnose disease. **Khon Kaen Agriculture Journal**, 46, Suppl. 1, 1130-1136.